

## Struktura filogeograficzna gatunków kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* (Poaceae) w Europie

MAGDALENA SZCZEPANIAK

SZCZEPANIAK, M. 2013. Phylogeographical structure of the species of *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* complex (Poaceae) in Europe. *Fragmenta Floristica et Geobotanica Polonica* 20(1): 109–130. PL ISSN 1640-629X.

ABSTRACT: The phylogeographical structure of the European xerothermophilous grass species of *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* complex (Poaceae) was assessed based on sequences of the non-coding *trnL-trnF* region of chloroplast DNA and AFLP data (obtained from the previous studies). Eleven haplotypes were detected within 88 populations collected from the entire distribution area. The clear geographic structure of cpDNA haplotypes was found. One main haplotype was widespread across Europe and was unique for all central and northern European population. The second high-frequency haplotype was distributed only on the Balkan Peninsula. In a marked contrast with non-variable more northerly populations, the greatest haplotype variation was revealed on the Iberian and Apennine Peninsulas, and somewhat smaller on the Balkan Peninsula, suggesting diversity centres and main glacial refugia in these regions. Among these southern refugia, probably mainly the Iberian Peninsula could have significantly contributed to postglacial re-colonisation of the more northerly parts of Europe. The some Apennine and Balkan lineages were clearly distinct and spread locally.

KEY WORDS: cpDNA sequences, genetic structure, glacial refugia, *Melica ciliata*, *Melica transsilvanica*, phylogeography

M. Szczepaniak, Instytut Botaniki im. W. Szafera PAN, ul. Lubicz 46, 31-512 Kraków, Polska;  
e-mail: m.szczepaniak@botany.pl

### WSTĘP

Flora i fauna zbiorowisk kserotermicznych Europy należą do najcenniejszych elementów różnorodności biologicznej, o czym decyduje występowanie wielu rzadkich i endemicznych gatunków (POSCHLOD & WALLISDEVRIES 2002; PÄRTEL i in. 2005). W Europie środkowej i zachodniej roślinność kserotermiczna ma charakter ekstrapołny i cechuje się wyspowym rozmieszczeniem, uwarunkowanym głównie czynnikami siedliskowymi. Zespoły stepowe, w ścisłym tego słowa znaczeniu, występują głównie w południowo-wschodniej części kontynentu, od dolnego Dunaju po środkową Wołgę i południowy Ural. Odrębną ośrodek roślinności stepowej znajduje się na Nizinie Węgierskiej. W Azji stepy zajmują południową część Niziny Zachodniosyberyjskiej, a dalej na wschodzie spotykamy je we wschodniej części Mongolii i na obszarach północno-wschodnich Chin (MEDWECKA-KORNAŚ & KORNAŚ 1977).

Półnaturalny charakter współczesnych muraw kserotermicznych w Europie środkowej decyduje o tym, że ich powstanie i przetrwanie w czasie jest uwarunkowane zarówno czynnikami klimatyczno-siedliskowymi, jak i ekstensywną działalnością rolniczą człowieka. W Europie, w związku z ograniczeniem bądź zaprzestaniem wypasu zwierząt i koszenia, a co za tym idzie szybko postępującą sukcesją krzewów i drzew, powierzchnia muraw kserotermicznych w ostatnich dziesięcioleciach bardzo szybko uległa zmniejszeniu i coraz większej fragmentacji (POSCHLOD & WALLISDEVRIES 2002; PÄRTEL i in. 2005).

Fragmentacja siedlisk może wpływać na efektywną wielkość populacji i na stopień izolacji pomiędzy populacjami. Wyniki badań potwierdzają, że poziom zmienności genetycznej ulega obniżeniu w małych i izolowanych populacjach na skutek erozji genetycznej, dryfu genetycznego i w konsekwencji akumulacji letalnych alleli (LYNCH i in. 1995; JOHANNESSON & ANDRÉ 2006). Jednak nie zawsze fragmentacja siedlisk prowadzi do obniżenia żywotności gatunku. Wykazano, że zmienność genetyczna *Grevillea caleyi* (*Proteaceae*) jest prawie wyłącznie efektem działania czynników historycznych, natomiast nie zależy od wielkości populacji ani stopnia izolacji między nimi (LLORENS i in. 2004). W innym przypadku stwierdzono, że wielkość przepływu genów utrzymuje stosunkowo wysoką zmienność genetyczną w silnie pofragmentowanych populacjach *Anthyllis vulneraria* (*Fabaceae*) (HONNAY i in. 2006).

Geneza flory kserotermicznej Europy została do tej pory w niewystarczającym stopniu wyjaśniona, w porównaniu np. do zakresu zbadania zbiorowisk gatunków górskich. Stosunkowo niewiele jest badań dotyczących stopnia izolacji poszczególnych kserotermicznych wysp zasięgowych w skali kontynentalnej, regionalnej (HONNAY i in. 2006) czy lokalnej (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2007). Interesująca pozostaje kwestia na ile współczesny, nieciągły charakter zasięgów wielu gatunków kserotermicznych jest uwarunkowany czynnikami historycznymi, a na ile zawdzięcza swe powstanie skokowym wędrówkom.

Badania nad pochodzeniem flor i historią zasięgów pozwalają prześledzić zmiany historyczne oraz określić czynniki kształtujące współcześnie istniejące wzory zasięgowe gatunków (HEWITT 2004). Oszacowanie przepływu genów pomiędzy populacjami i gatunkami, określenie znaczenia dryfu genetycznego oraz poznanie biologii gatunków są niezbędne, ale niewystarczające do wyjaśnienia współczesnych wzorców występowania i zróżnicowania flory Europy. Wydarzenia geologiczne i zmiany klimatyczne, zwłaszcza w czasie glacjałów i interglacjałów, odegrały kluczową rolę w ukształtowaniu obecnego układu biogeograficznego Europy (HEWITT 2000, 2004).

Dotychczasowe badania filogeograficzne, zajmujące się analizą rozmieszczenia i wzajemnych relacji pomiędzy różnymi liniami rodowymi w obrębie zasięgu występowania gatunków (AVISE 2000, 2009), pozwoliły na sformułowanie hipotez dotyczących lokalizacji głównych europejskich obszarów refugialnych na południowych półwyspach Europy: Iberyjskim, Apenińskim i Bałkańskim (TABERLET i in. 1998), skąd po okresie zlodowaceń nastąpiła kolonizacja bardziej na północ położonych obszarów kontynentu. W ostatnich latach, potwierdzono istnienie refugium północnych (kryptycznych) w Europie Środkowej i Karpatach Zachodnich (STEWART & LISTER 2001; WILLIS & VAN ANDEL 2004; DANECK i in. 2011). Refugia północnoafrykańskie (VILA i in. 2005), kaukazkie oraz środkowo- i północnoazjatyckie (SCHÖNSWETTER i in. 2006) były również ważnymi ośrodkami, z których nastąpiła kolonizacja wschodniej i środkowej Europy.

Lokalizacja obszarów refugialnych została dobrze udokumentowana danymi paleobotanicznymi (w postaci pyłku, spor, nasion, owoców oraz fragmentów organów roślinnych). Zwłaszcza duża ilość pyłku wiatropylnych drzew klimatu umiarkowanego, umożliwiła jednoznaczoną identyfikację gatunków i datowanie profilów pyłkowych (RALSKA-JASIEWICZOWA i in. 2004; MAGRI 2008). Oznaczenie natomiast gatunków zielnych w profilach pyłkowych zwykle nie jest możliwe. Szczątki roślin siedlisk suchych są również rzadko spotykane w materiałach paleobotanicznych, ponieważ brak wilgoci uniemożliwia ich konserwację (NALEPKA 2005). Makroskopowe fragmenty roślin suchych siedlisk są za to znajduwane w obiektach archeologicznych, gdzie np. odnaleziono zwęglone fragmenty ości i ziarniaków kserotermicznej trawy *Stipa pennata* (MUELLER-BIENIEK & NALEPKA 2010). Badania genetyczne leśnych gatunków traw, jak np. *Hordelymus europaeus* (DVOŘÁKOVÁ i in. 2010) czy *Melica nutans* (TYLER 2002) oraz innych roślin zielnych, takich jak *Veronica chamaedrys* (BARDY i in. 2010) potwierdziły istnienie wzorców filogeograficznych skorelowanych ze wzorcami współwystępujących gatunków drzew, istnienie refugium na południu Europy oraz rozrzuconych mikro-refugium w Europie środkowej.

W wyniku postglacjalnego rozprzestrzeniania się populacji z refugium dochodziło do kontaktu poprzednio izolowanych linii genetycznych, czego efektem było powstanie stref kontaktu (ang. *contact zones*) albo/i stref mieszańcowości (ang. *hybrid zones*), charakteryzujących się wtórnie zwiększoną zmiennością genetyczną (TABERLET i in. 1998; HEWITT 1999, 2004). Strefy kontaktu gatunków powstały w określonych rejonach geograficznych, niemniej jednak dokładna lokalizacja i cechy charakterystyczne takich obszarów wydają się być specyficzne dla poszczególnych gatunków (HEWITT 1999; WILLIS & VAN ANDEL 2004; FÉR i in. 2007; MAGRI 2008; DVOŘÁKOVÁ i in. 2010). Stwierdzono, że Europa środkowa była obszarem strefy styku linii genetycznych takich gatunków, jak np. *Festuca pratensis* (FJELLHEIM i in. 2006), *Rhinanthus angustifolius* (VRANCKEN i in. 2009), *Rosa pendulina* (FÉR i in. 2007) czy *Lonicera nigra* (DANECK i in. 2011).

Taksony kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* (sekcja *Dalycum* Dumort., podsekcja *Ciliatae* (Lavrenko) Bor; HEMPEL 2011) są związane w Europie ze zbiorowiskami kserotermicznymi. Kompleks obejmuje eurazjatycko-sub-śródziemnomorskie taksony, występujące w oceanicznych, otwartych i skalistych oraz kontynentalnych, leśno-stepowych siedliskach (HEMPEL 1970, 2011). Do kompleksu włączane są: *M. ciliata* L., *M. ciliata* subsp. *magnolii* (Gren. & Godr.) Richter [syn. *M. magnolii* Gren. & Godr.], *M. ciliata* subsp. *glauca* (F. W. Schultz) Richter, *M. ciliata* subsp. *taurica* (K. Koch) Tzvelev [syn. *M. taurica* K. Koch], *M. transsilvanica* Schur oraz *M. transsilvanica* subsp. *klokovii* Tzvelev.

*Melica ciliata* jest gatunkiem, którego ciągly zasięg rozciąga się od obszaru nad Atlantykiem i Morzem Śródziemnym, poprzez Europę środkową do pojedynczych stanowisk na Ukrainie (HULTÉN & FRIES 1986). Dysjunktywne części zasięgu *M. ciliata* obejmują południe Półwyspu Skandynawskiego i północ Afryki. *M. ciliata* rośnie na stanowiskach słonecznych, suchych, na glebie zasadowej, ubogiej, często kamienistej.

*Melica ciliata* subsp. *magnolii* występuje na obszarze śródziemnomorskim południowo-zachodniej Europy (Włochy z Sycylią i Sycylią, Francja z Korsyką, Hiszpania z Balearami oraz Portugalia) i południowo-zachodniej Azji (zachodnia Turcja). Jest gatunkiem rosnącym w zbiorowiskach ciepłolubnych i subnitrofilnych muraw, często wzdłuż dróg

w zbiorowiskach przekształconych oraz na płytkich i kamienistych glebach w pionierskich zbiorowiskach niższych położeniach górskich, do wysokości 800 m n.p.m. (HEMPEL 2011).

*Melica ciliata* subsp. *glauca* występuje w środkowej, zachodniej i południowej Europie oraz w obszarze śródziemnomorskim, często wspólnie z subsp. *magnolii* (HEMPEL 2011).

*Melica ciliata* subsp. *taurica* rośnie na skalistych zboczach i skałach. W Europie występuje na stepowym pogórzu Krymu oraz na południowym Krymie od obszarów nadmorskich do piętra lasów sosnowych. Gatunek występuje również w południowo-wschodniej Europie, w Grecji. Dalej na wschód, spotykany jest na Kaukazie oraz w Azji Środkowej (HEMPEL 2011).

*Melica transsilvanica* swoim zasięgiem obejmuje Azję Środkową, Środkowy Wschód, Kaukaz, wschodnią i środkową Europę, na zachodzie sięgając do południowej Francji i północnych Włoch (HULTÉN & FRIES 1986). Charakteryzuje się szerszą tolerancją ekologiczną niż *M. ciliata* i rośnie w Europie na suchych, słonecznych zboczach, skałach, w ciepłolubnych murawach i zaroślach, na glebach powstałych na bazaltach, łupkach albo wapieniach, czasami bogatych w związki azotu.

Zasięg występowania *Melica transsilvanica* subsp. *klokovii* obejmuje obszar śródziemnomorski (Włochy), Półwysep Bałkański (Czarnogóra, Chorwacja, Bośnia i Hercegowina), zachodnią Turcję, południową Ukrainę i Mołdawię, gdzie spotykany jest często w zbiorowiskach razem z subsp. *transsilvanica* (HEMPEL 2011).

Kompleks *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* stanowi taksonomicznie problematyczną grupę roślin. Identyfikację taksonów utrudnia szeroki zakres zmienności i podobieństwo cech morfologicznych (HEMPEL 1970, 2004, 2011; SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2011) oraz powstawanie naturalnych mieszańców międzygatunkowych. Zmienność morfologiczna dotyczy zwłaszcza barwy liści i stopnia ich zwinięcia, występowania włosków na wegetatywnych częściach roślin, długości i liczby kolanek źdźbła oraz rozpiętości, gęstości i stopnia rozgałęzienia gałązek wiechy. Ujęcia taksonomiczne badaczy tego kompleksu różniły się zarówno pod względem liczby wyróżnianych taksonów, jak i nadawanej im rangi (PAPP 1933; HEMPEL 1970, 2011; TUTIN 1980). *M. transsilvanica* przez długi czas traktowana była jako podgatunek albo odmiana w obrębie *M. ciliata* (HINKOVA 1963; PAPP & BELDIE 1972; DAVIS 1985). Z kolei *M. magnolii* i *M. taurica* ujmowane są obecnie jako podgatunki *M. ciliata* (HEMPEL 2011).

Analiza wyłącznie zmienności morfologicznej jest niewystarczająca do stworzenia jednoznaczego opisu taksonów kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica*, jak również do określenia wzajemnych powiązań filogenetycznych (TYLER 2004). Rozległy obszar występowania taksonów kompleksu od Azji Środkowej do Europy i północnej części Afryki może sugerować różne filogeograficzne historie kształtowania poszczególnych części zasięgu. Interesujące są również historyczne powiązania populacji *M. ciliata* z ciągłego zasięgu z obszarami dysjunktywnymi na południu Półwyspu Skandynawskiego.

Badania allozymatyczne kompleksu wykazały, że populacje cechowały się niskim poziomem zmienności genotypowej i utrwalonymi wzorami heterozygotycznymi dla większości analizowanych loci (TYLER 2004). U taksonów tworzących kompleks, które są wyłącznie diploidami o liczbie chromosomów  $2n=18$  (MOORE 1982), odkryto również duplikację loci enzymatycznych o ograniczonej rekombinacji (TYLER 2004), co może być, alternatywnym do poliploidyzacji, sposobem ewolucyjnego zwiększenia poziomu zmienności osobniczej i przez to możliwości adaptacyjnych do różnych warunków środowiska (STEBBINS 1985).

Wyniki wcześniejszych badań kompleksu nie dały jednoznacznych odpowiedzi na wiele pytań dotyczących relacji filogenetycznych pomiędzy taksonami (TYLER 2004; HEMPEL 2011), dlatego podjęto szerokie badania oparte na genetycznych analizach zarówno markerów chloroplastowego DNA (cpDNA), jak i całkowitego DNA genomowego (ang. *genomic fingerprinting*). Głównym celem przeprowadzonych badań było określenie związków filogeograficznych pomiędzy taksonami kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie. Szczegółowe cele dotyczyły: (1) oszacowania poziomu zmienności i zróżnicowania genetycznego taksonów, (2) ustalenia związku pomiędzy zróżnicowaniem genetycznym a położeniem geograficznych populacji taksonów kompleksu, (3) określenia czynników kształtujących strukturę genetyczną taksonów, (4) próby odtworzenia postglacjalnych kierunków i dróg migracji taksonów kompleksu *M. ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie.

Powyższe cele zostały zrealizowane w oparciu o wyniki kompleksowych badań własnych, w których wykorzystano analizy polimorfizmu cpDNA oraz polimorfizmu długości amplifikowanych fragmentów (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism* – AFLP). Prezentowana praca zawiera oryginalne dane otrzymane na podstawie analizy zróżnicowania regionu *trnL-trnF* cpDNA, dane publikowane (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2006, 2007, 2009, 2011) oraz własne dane niepublikowane (SZCZEPANIAK msk.) dotyczące kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica*.

## MATERIAŁ I METODY

### Zbiór materiału roślinnego

Populacyjny materiał roślinny do badań genetycznych zebrany został z całego europejskiego zasięgu taksonów kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* tak, aby możliwe było oszacowanie między- i wewnątrzpopulacyjnej zmienności oraz relacji między morfologicznie wyróżnionymi taksonami. Badania genetyczne DNA chloroplastowego (cpDNA) oparto na materiale roślinnym zebrany z 87 populacji kompleksu i jednej populacji *M. cupani* Guss. (Tab. 1). Ujęcie taksonomiczne oraz identyfikację taksonów oparto na pracy HEMPLA (2011). Z każdej populacji, w zależności od jej wielkości i zróżnicowania morfologicznego, zebrano świeże liście z 3–10 osobników, oddalonych od siebie o ok. 5–8 m. W sumie przeanalizowano 431 roślin. Liście bezpośrednio po ich zebraniu, umieszczane były w szczelnie zamykanych torebkach foliowych z żelazem krzemionkowym i przechowywane w nich w temperaturze pokojowej do czasu izolacji DNA.

### Izolacja DNA i analiza molekularna

Całkowite DNA genomowe wyizolowano z fragmentów wysuszonych liści (ok. 20 mg), przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), według procedury podanej przez producenta. Jakość i ilość wyizolowanego DNA sprawdzono za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

### Amplifikacja i sekwencjonowanie DNA chloroplastowego (cpDNA)

Sekwencjonowanie cpDNA wykonano metodą z fluorescencyjnie znakowanymi terminatorami reakcji (metoda Sangera). We wstępnym etapie badań, w celu stwierdzenia potencjalnej zmienności i zróżnicowania w kompleksie, przeanalizowano 16 niekodujących regionów cpDNA, z zastosowaniem dostępnych uniwersalnych starterów: *trnL-trnF* (TABERLET i in. 1991), *atpB-rbcL* (GOLEBERG i in. 1993), *psbA-trnH*, *rpoB-trnC*, *trnG-trnG2G*, *trnS-trnFM*, *rps12-rpl20*, *trnC-ycf6* (SHAW i in. 2005 i lit. tam cytowana),

**Tabela 1.** Stanowiska zbioru prób badanych populacji oraz stwierdzone w nich haplotypy u poszczególnych osobników taksonów kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica*. Numery odpowiadające poszczególnym populacjom zamieszczone na mapie (Ryc. 1)

**Table 1.** Sampling localities for the studied populations and individuals with particular haplotypes of *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* complex. Locality numbers correspond with those indicated on the map (Fig. 1)

Nr populacji (Population number)	Takson (Taxon)	Liczba osobników (Number of individuals)	Stanowisko (Locality)	Współrzędne geograficzne (Geographical co-ordinates)	Haplotypy (Haplotypes)
1	<i>cupani</i>	5	Hiszpania, Sierra Nevada	37°08'N, 03°26'W	H8 (5)
2	<i>magnolii</i>	5	Hiszpania, k. Ocaña	39°57'N, 03°28'W	H5 (1), H7 (4)
3	<i>magnolii</i>	5	Hiszpania, Puerto Serrano	36°53'N, 05°33'W	H1 (1), H5 (2), H6 (1), H10 (1)
4	<i>magnolii</i>	5	Hiszpania, San José del Valle	36°36'N, 05°42'W	H9 (3), H10 (2)
5	<i>ciliata</i>	5	Hiszpania, Pireneje, k. Hecho	42°48'N, 00°43'W	H1 (5)
6	<i>ciliata</i>	5	Hiszpania, Pireneje, k. Jaca	42°37'N, 00°32'W	H1 (5)
7	<i>magnolii</i>	5	Hiszpania, Pireneje, k. Gavin	42°37'N, 00°18'E	H5 (1), H6 (4)
8	<i>magnolii</i>	5	Hiszpania, k. Santa Coloma de Farners	41°53'N, 02°39'E	H1 (5)
9	<i>ciliata</i>	5	Francja, k. Millau	44°02'N, 02°57'E	H1 (5)
10	<i>ciliata</i>	5	Francja, k. Alés	44°09'N, 04°05'E	H1 (5)
11	<i>ciliata</i>	5	Francja, Alpy Zachodnie, Confolens	44°55'N, 06°00'E	H1 (5)
12	<i>magnolii</i>	5	Francja, Alpy Zachodnie, k. Mizoën	45°02'N, 06°12'E	H1 (5)
13	<i>ciliata</i>	5	Francja, k. Guillaumes	44°09'N, 06°45'E	H1 (5)
14	<i>ciliata</i>	5	Francja, Alpy Nadmorskie, k. Valberg	44°03'N, 06°58'E	H1 (5)
15	<i>ciliata</i>	5	Włochy, Alpy Nadmorskie, Pietraporzio	44°20'N, 07°01'E	H1 (5)
16	<i>ciliata</i>	5	Włochy, Alpy Nadmorskie, k. Demonte	44°18'N, 07°20'E	H1 (5)
17	<i>ciliata</i>	3	Włochy, Alpy Zachodnie, Salbertrand	45°04'N, 06°52'E	H1 (3)
18	<i>ciliata</i>	5	Szwajcaria, Crésuz	46°37'N, 07°08'E	H1 (5)
19	<i>ciliata</i>	5	Włochy, Castelnuovo di Garfagnana	44°15'N, 10°33'E	H1 (5)
20	<i>ciliata</i>	5	Włochy, Apeniny Toskańsko-Emiliańskie, k. Sestola	44°14'N, 10°47'E	H8 (5)
21	<i>ciliata</i>	5	Włochy, Crevole	43°07'N, 11°24'E	H1 (5)
22	<i>magnolii</i>	5	Włochy, k. Cinigiano	42°56'N, 11°16'E	H1 (5)
23	<i>magnolii</i>	5	Włochy, Montefiascone	42°33'N, 12°01'E	H1 (5)
24	<i>magnolii</i>	5	Włochy, Monte Amiata	42°55'N, 11°30'E	H1 (5)
25	<i>ciliata/ magnolii</i>	6	Włochy, k. Alatri	41°48'N, 13°18'E	H1 (1), H3 (3), H4 (1), H11 (1)
26	<i>ciliata/ magnolii</i>	10	Włochy, k. Sora	41°43'N, 13°46'E	H1 (3), H3 (5), H7 (2)
27	<i>ciliata</i>	4	Włochy, k. Bagnara Calabria	38°17'N, 15°48'E	H1 (4)
28	<i>ciliata</i>	5	Włochy, Alpy Julijskie, Gemona del Friuli	46°18'N, 13°07'E	H1 (5)
29	<i>ciliata</i>	5	Słowenia, Lipa, Trstelj Mt.	45°51'N, 13°42'E	H1 (5)
30	<i>ciliata</i>	6	Słowenia, Ljubljana, Polhograjska Grmada Mt.	46°05'N, 14°20'E	H1 (6)
31	<i>ciliata</i>	5	Chorwacja, wyspa Krk, Silo	45°12'N, 14°35'E	H1 (5)
32	<i>ciliata</i>	4	Chorwacja, Pasjak	45°29'N, 14°14'E	H1 (4)
33	<i>transsilvanica</i>	5	Austria, k. Winden am See	47°57'N, 16°46'E	H1 (5)
34	<i>transsilvanica</i>	7	Węgry, k. Márko	47°06'N, 17°49'E	H1 (7)

Tabela 1. Kontynuacja – Table 1. Continued

Nr populacji (Population number)	Takson (Taxon)	Liczba osobników (Number of individuals)	Stanowisko (Locality)	Współrzędne geograficzne (Geographical co-ordinates)	Haplotypy (Haplotypes)
35	<i>transsilvanica</i>	5	Węgry, Pécs, Misina Mt.	46°04'N, 18°13'E	H1 (5)
36	<i>ciliata</i>	5	Węgry, Budaörs	47°28'N, 18°56'E	H1 (5)
37	<i>transsilvanica</i>	5	Rumunia, Cojocna	46°45'N, 23°50'E	H1 (5)
38	<i>transsilvanica</i>	5	Rumunia, Suatu	46°46'N, 23°58'E	H1 (5)
39	<i>ciliata</i>	5	Rumunia, Cheile Turzii	46°33'N, 23°40'E	H1 (5)
40	<i>ciliata</i>	5	Rumunia, Suatu	46°46'N, 23°58'E	H1 (5)
41	<i>ciliata</i>	5	Rumunia, k. Sighișoara	45°59'N, 25°18'E	H1 (5)
42	<i>ciliata</i>	5	Rumunia, k. Bucea	46°56'N, 22°43'E	H1 (5)
43	<i>glauca</i>	5	Rumunia, k. Oradea	46°56'N, 22°43'E	H1 (5)
44	<i>ciliata</i>	5	Niemcy, Langenthalheim	48°53'N, 10°55'E	H1 (5)
45	<i>ciliata</i>	6	Niemcy, k. Magdala	50°54'N, 11°27'E	H1 (6)
46	<i>ciliata</i>	5	Szwecja, Högsrum	56°40'N, 16°35'E	H1 (5)
47	<i>ciliata</i>	5	Szwecja, Omberg Mt.	58°20'N, 14°41'E	H1 (5)
48	<i>ciliata</i>	4	Szwecja, Marmorbruket	58°40'N, 16°24'E	H1 (4)
49	<i>transsilvanica</i>	5	Czechy, k. Kyjov	49°00'N, 17°00'E	H1 (5)
50	<i>transsilvanica</i>	6	Czechy, Znojmo	48°51'N, 15°51'E	H1 (6)
51	<i>transsilvanica</i>	5	Czechy, Hodonin	49°30'N, 16°25'E	H1 (5)
52	<i>transsilvanica</i>	5	Czechy, Pozorice	49°12'N, 16°47'E	H1 (5)
53	<i>transsilvanica</i>	5	Polska, Przedgórze Sudeckie, Strzegom, Góra Krzyżowa	50°59'N, 16°20'E	H1 (5)
54	<i>transsilvanica</i>	5	Polska, Przedgórze Sudeckie, Dobromierz, Góra Dębowa	50°55'N, 16°15'E	H1 (5)
55	<i>transsilvanica</i>	5	Polska, Sudety, Mysłów-Sobocin, Wapienna Góra	50°59'N, 15°59'E	H1 (5)
56	<i>transsilvanica</i>	5	Polska, Wyż. Krakowsko-Często- chowska, Wąwóz Bolechowicki	50°09'N, 19°47'E	H1 (5)
57	<i>transsilvanica</i>	5	Polska, Pieniny, Góra Szafranówka	49°25'N, 20°28'E	H1 (5)
58	<i>transsilvanica</i>	5	Polska, Pieniny, Falsztyn	49°27'N, 20°17'E	H1 (5)
59	<i>transsilvanica</i>	3	Ukraina, Podole, Kamieniec Podolski	48°40'N, 26°33'E	H1 (3)
60	<i>transsilvanica</i>	7	Ukraina, Podole, k. Ustâ	48°33'N, 26°41'E	H1 (7)
61	<i>transsilvanica</i>	4	Ukraina, Podole, k. Verbka	48°48'N, 26°36'E	H1 (4)
62	<i>transsilvanica</i>	5	Ukraina, Gubkiv	50°49'N, 27°02'E	H1 (5)
63	<i>transsilvanica</i>	3	Ukraina, Korsun´ Shevchenkivs´kyi	49°25'N, 31°15'E	H1 (3)
64	<i>klokovii</i>	3	Ukraina, Krym, Mramorne, góra Tas-Tau	44°49'N, 34°16'E	H1 (3)
65	<i>taurica</i>	5	Ukraina, Krym, Mramorne, Cha- tyr-Dah jajla	44°47'N, 34°16'E	H4 (5)
66	<i>taurica</i>	3	Ukraina, Krym, Demerdži jajla	44°44'N, 34°25'E	H2 (3)
67	<i>transsilvanica</i>	6	Rosja, Volgograd	48°48'N, 44°35'E	H1 (6)
68	<i>ciliata</i>	4	Bośnia i Hercegowina, Góry Dynarskie, k. Nevesinje	43°14'N, 17°58'E	H3 (4)
69	<i>ciliata</i>	4	Czarnogóra, k. Rozaje	42°47'N, 20°13'E	H1 (4)
70	<i>ciliata</i>	4	Albania, Góry Dynarskie, k. Bradashesh	41°06'N, 19°59'E	H2 (2)
71	<i>ciliata</i>	4	Grecja, Góry Pindos, k. Metsowo	39°45'N, 21°10'E	H1 (4)
72	<i>ciliata</i>	3	Grecja, Góry Dynarskie, k. Kriovrisi	40°29'N, 21°35'E	H2 (3)

Tabela 1. Kontynuacja – Table 1. Continued

Nr populacji (Population number)	Takson (Taxon)	Liczba osobników (Number of individuals)	Stanowisko (Locality)	Współrzędne geograficzne (Geographical co-ordinates)	Haplotypy (Haplotypes)
73	<i>ciliata</i>	4	Grecja, Góry Dynarskie, k. Agios Dimitrios	40°06'N, 22°12'E	H2 (4)
74	<i>ciliata</i>	5	Grecja, Thessalia	39°30'N, 22°00'E	H2 (5)
75	<i>ciliata</i>	4	Serbia, k. Vranje	42°34'N, 21°53'E	H1 (1), H2 (3)
76	<i>transsilvanica</i>	4	Bułgaria, k. Brest	43°37'N, 24°38'E	H1 (4)
77	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, k. Milanovo	43°06'N, 23°24'E	H2 (5)
78	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, k. Petrič	42°38'N, 23°59'E	H2 (5)
79	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Poduene	42°41'N, 23°21'E	H2 (5)
80	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Hisar	42°30'N, 24°42'E	H2 (5)
81	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Góry Riła	42°07'N, 23°13'E	H2 (4)
82	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Rodopy, Vlahovo	41°34'N, 24°48'E	H2 (5)
83	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Boudzboudzha	42°45'N, 25°19'E	H2 (5)
84	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Velingrad	42°05'N, 24°07'E	H1 (1), H2 (4)
85	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Sofia, Lalina mogila Mt.	42°35'N, 23°29'E	H2 (5)
86	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Sofia, Vitosha Mt.	42°38'N, 23°13'E	H2 (5)
87	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Elenite	42°42'N, 27°48'E	H2 (5)
88	<i>ciliata</i>	5	Bułgaria, Sveti Vlas	42°43'N, 27°46'E	H2 (5)

*petL-psbE*, *rpl32-trnL*, *petA-psbJ*, *trnQ-rps16*, *ndhF-rpl32*, *psbD-trnT*, *trnK-rps16* oraz *ndhJ-trnF* (SHAW i in. 2007 i lit. tam cytowana). Piętnaście testowanych roślin (po jednej roślinie z populacji) należało do różnych taksonów określonych morfologicznie oraz pochodziło z całego zasięgu kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica*. Testowane regiony cpDNA cechowały się bardzo niskim poziomem zmienności w kompleksie. Stwierdzono natomiast, że region *trnL-trnF* charakteryzował się największym polimorfizmem. W związku z tym, przeprowadzono analizę zmienności tego regionu dla całego badanego materiału roślinnego. Do amplifikacji DNA i sekwencjonowania wykorzystano uniwersalne primery *trnL<sup>UAA</sup>* i *trnF<sup>GAA</sup>* (TABERLET i in. 1991).

Amplifikację DNA przeprowadzono z użyciem *Taq* Gold polimerazy (Applied Biosystems). Przed sekwencjonowaniem produkty PCR oczyszczono (High Pure PCR Product Purification Kit; Roche Diagnostic). Sekwencjonowanie wykonano z użyciem BigDye Terminator ver. 3.1 (Applied Biosystems) i 5× buforu sekwencyjnego według protokołu producenta. Oczyszczone próbki PCR, zawieszane w formamidzie, rozdzielono elektroforetycznie za pomocą sekwencera ABI 3100-*Avant* (Applied Biosystems) i następnie przeanalizowano za pomocą programu DNA Sequencing Analysis Software ver. 5.1 (Applied Biosystems). Amplikony były sekwencjonowane w dwóch kierunkach w celu sprawdzenia wiarygodności stwierdzonych różnic.

### Analiza sekwencji nukleotydowych cpDNA

Sekwencje cpDNA zostały opracowane i wyrównane za pomocą programu BioEDIT 7.1.3 (HALL 1999). Liczbę, frekwencję i zależności pomiędzy haplotypami obliczono i przeanalizowano z użyciem programu TCS 1.21 (CLEMENT i in. 2000; POSADA & CRANDALL 2001). Program ten tworzy sieć połączeń między haplotypami na podstawie algorytmu parsymonii (ang. *parsimony algorithm*). Część zmienności regionu *trnL-trnF* dotyczyła długości mononukleotydowych powtórzeń poli-A/poli-T, które mogą być homoplastyczne w obrębie dużego zasięgu geograficznego gatunków i pomiędzy taksonami (KELCHNER 2000; INGVARSSON i in. 2003). Niemniej jednak, powtórzenia mononukleotydowe z powodzeniem były wykorzystywane w badaniach filogeograficznych do szacowania liczby haplotypów i analiz zmienności



DNA (NACIRI & GAUDEUL 2007; RONIEMIER i in. 2008). W celu potwierdzenia powtarzalności otrzymanych danych dla pojedynczych osobników z populacji wykonano powtórny reakcję amplifikacji. Nie stwierdzono różnic pomiędzy powtórzeniami oraz porównaniami sekwencji z końców 5'–3' oraz 3'–5' łańcucha nukleotydowego. Jednocześnie zaobserwowano, że różnice w długości sekwencji poli-A/poli-T nie są przypadkowe. Zauważono, że charakteryzują one poszczególne populacje (występując u wszystkich analizowanych roślin) lub są skorelowane z rozmieszczeniem geograficznym populacji. W związku z powyższym, wszystkie stwierdzone sekwencje poli-A/poli-T włączono do analiz. Sekwencje badanego regionu *trnL-trnF* cpDNA dla poszczególnych taksonów złożono w bazie GenBank.

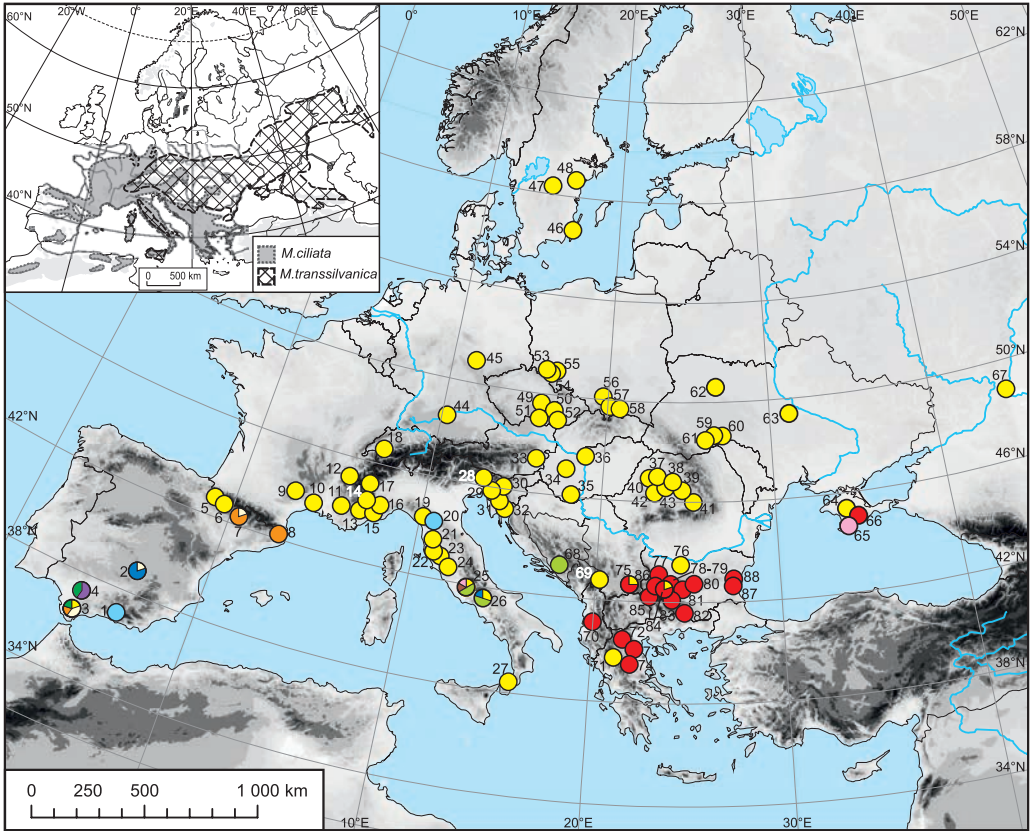
## WYNIKI BADAŃ

Długość otrzymanych i analizowanych sekwencji regionu *trnL-trnF* wynosiła 791 par zasad. W sumie zidentyfikowano sześć pozycji polimorficznych w łańcuchu nukleotydowym cpDNA: jedną substytucję nukleotydową, jedną mutację strukturalną o charakterze insercji/delecji (indel) oraz cztery łańcuchy mononukleotydowe poli-A/poli-T o zróżnicowanej długości (Tab. 2). Pięcionukleotydowy indel został zredukowany tak, aby reprezentować

**Tabela 2.** Zestawienie zmiennych pozycji nukleotydowych w regionie *trnL-trnF* DNA chloroplastowego, na podstawie których wyróżniono jedenaście haplotypów (H1–H11) w kompleksie *Melica ciliata* – *M. transsilvanica*. Podano częstość występowania danego haplotypu u osobników i w populacjach

**Table 2.** Summary of variable positions in the cpDNA *trnL-trnF* region determining eleven haplotypes (H1–H11) within *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* complex. Frequencies of particular haplotypes in individuals and populations were given

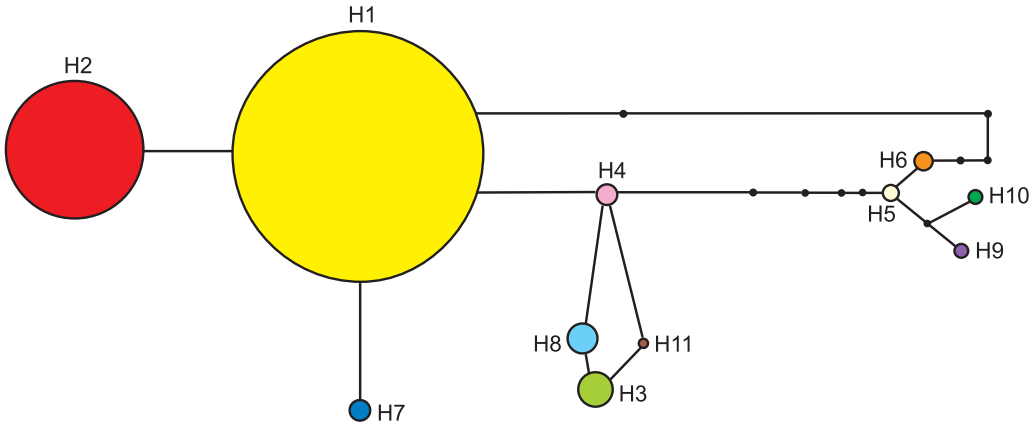
Haplotyp / częstość – osobniki, populacje (Haplotype / frequency – individuals, populations)	<i>trnL-trnF</i>					
	146pz	208–217pz	227–236pz	227–236pz	290–292pz	665–669pz
H1/302 osobniki – 70,1%, 64 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT– – –	AAA	TCTGC
H2/79 osobników – 18,3%, 18 populacji	T	AAAAAAAAA –	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT– – –	AAA	TCTGC
H3/12 osobników – 2,8%, 3 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT–	TTTTTTTTTTT– –	AA–	TCTGC
H4/6 osobników – 1,4%, 2 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT– –	AA–	TCTGC
H5/4 osobniki – 0,9%, 3 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT– –	AAA	TCTGC
H6/5 osobników – 1,2%, 2 populacje	T	AAAAAAAAA	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT– – –	AAA	TCTGC
H7/6 osobników – 1,4%, 2 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT – –	AAA	– – – – –
H8/10 osobników – 2,3%, 2 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTT– – –	AAA	– – – – –
H9/3 osobniki – 0,7%, 1 populacja	C	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTT–	AAA	– – – – –
H10/3 osobniki – 0,7%, 2 populacje	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT	TTTTTTTTTTTT	AAA	– – – – –
H11/1 osobnik – 0,2%, 1 populacja	T	AAAAAAAAA–	TTTTTTTTTT–	TTTTTTTTTTT– –	AAA	TCTGC



**Ryc. 1.** Rozmieszczenie haplotypów (H1–H11) w zasięgu występowania kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie. Poszczególne numery odpowiadają numerom populacji zawartym w tabeli 1, a kolory – 11 wyróżnionym haplotypom, których zależności przedstawiono na rycinie 2

**Fig. 1.** Geographical distribution of haplotypes (H1–H11) within the range of *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* complex in Europe. The particular number refers to the population numbers (Table 1) and the colours are the same as on the figure 2

pojedynczą mutację w analizie za pomocą programu Tcs. Pomimo niewielkiej zmienności regionu *trnL-trnF*, analiza wykazała występowanie 11 haplotypów u 431 roślin taksonów kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* na obszarze całego badanego zasięgu (Ryc. 1, 2, Tab. 1, 2). W Europie stwierdzono występowanie dwóch dominujących haplotypów: H1 (u 302 roślin, co stanowi 70% wszystkich badanych) i H2 (u 79 roślin, tj. u 18%). Rozmieszczenie haplotypu H1 rozciąga się od południowej Hiszpanii, gdzie został stwierdzony tylko u jednej rośliny w populacji 3, poprzez Pireneje, występując u wszystkich roślin z dwóch populacji (populacje 5 i 6; Tab. 1), poprzez Alpy Zachodnie i Alpy Wschodnie, będąc jedynym zanotowanym haplotypem na tym obszarze. Obecność haplotypu H1 stwierdzono również na południowym krańcu Półwyspu Apenińskiego (populacja 27), w jego centrum i na północy. Rozmieszczenie drugiego pod względem frekwencji haplotypu H2 ograniczone było do Bałkanów (16 populacji) i Krymu (populacja 66; Ryc. 1, Tab. 1).



**Ryc. 2.** Sieć haplotypów stwierdzonych w kompleksie *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* na podstawie analizy regionu *trnL-trnF* cpDNA. Poszczególne kolory odpowiadają 11 wyróżnionym haplotypom, których rozmieszczenie geograficzne przedstawiono na rycinie 1. Wielkość okręgów (H2–H11) jest proporcjonalna do liczby osobników, posiadających dany haplotyp. Okrąg opowiadający haplotypowi H1 został 2,5 krotnie zmniejszony w celu poprawienia czytelności ryciny. Czarne punkty reprezentują hipotetyczne haplotypy (ang. *missing haplotypes*) łączące stwierdzone haplotypy zgodnie z zasadą największej parsymonii

**Fig. 2.** Parsimony network among the cpDNA *trnL-trnF* region haplotypes. The color of the circles refers to the eleven haplotypes; their geographical distribution is presented on the Fig. 1. Circles sizes (H2–H11) are proportional to the number of individuals with a particular haplotype. Circle of H1 haplotype was decreased two and half times to improve the figure clarity. Black points represent hypothetical missing haplotypes not represented in the real data set

Otrzymana sieć haplotypów wykazała obecność 2 grup haplotypów (Ryc. 2). Haplotypy H5, H6, H9 i H10 tworzyły najbardziej odrębną grupę i występowały tylko na Półwyspie Iberyjskim. Drugą grupę tworzyły haplotypy H3, H4, H8 i H11, obecne w większości na Półwyspie Apenińskim oraz z mniejszą frekwencją na Półwyspie Iberyjskim (populacja 1), na Bałkanach (populacja 68) oraz na Krymie (populacja 65). Haplotyp H11 był unikatowy dla Półwyspu Apenińskiego (populacja 25).

Populacyjna zmienność haplotypowa charakteryzowała przede wszystkim populacje z Półwyspu Iberyjskiego, gdzie wśród 5 badanych roślin stwierdzono obecność 4 różnych haplotypów (populacja 3) oraz po 2 różne haplotypy (populacje 2, 4 i 7, Tab. 1). Populacje z centrum Półwyspu Apenińskiego również były bardzo zmienne – w populacji 25 odnotowano – 4, a w populacji 26 – 3 różne haplotypy.

## DYSKUSJA

### Charakterystyka struktury genetycznej kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie

W skali Europy populacje kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* charakteryzują się niskim poziomem zmienności genetycznej sekwencji DNA chloroplastowego. Większość europejskiego zasięgu kompleksu została zdominowana przez jeden haplotyp H1 (Ryc. 1).

Drugi pod względem częstości haplotyp H2 występował jedynie na Bałkanach i Krymie. Generalnie, znaczna część zmienności haplotypów była związana z polimorfizmem łańcuchów mononukleotydowych, podczas gdy stwierdzono tylko jedną substytucję nukleotydową. Największe zróżnicowanie i odrębność haplotypową odnotowano na Półwyspach Apenińskim i Iberyjskim, gdzie u zbadanych 50 roślin (12% całości) stwierdzono 9 haplotypów (81% całej zmienności haplotypowej). Na Półwyspie Iberyjskim zanotowano 4 unikatowe haplotypy, natomiast na Półwyspie Apenińskim stwierdzono 1 odrębny haplotyp, nie występujące nigdzie poza tymi obszarami. Populacje, w których występują haplotypy H1 i H2 nie wykazują ogólnie zmienności, natomiast w populacjach z Półwyspów Apenińskiego i Iberyjskiego z różną frekwencją i w różnych kombinacjach występują haplotypy H1 oraz H3–H11. Całkowita jednolitość, albo bardzo niska zmienność w niekodujących regionach cpDNA w skali europejskiej nie jest czymś wyjątkowym i stwierdzana była np. u *Carex pilosa* (REJZKOVA i in. 2008), *Corylus avellana* (PALME & VENDRAMIN 2002) czy *Carex atrofusca* (SCHÖNSWETTER i in. 2006). Niski poziom zróżnicowania w kompleksie *M. ciliata* – *M. transsilvanica* na przeważającym obszarze Europy, może być spowodowany szybką postglacjalną kolonizacją, czego skutkiem jest duża homogeniczność cpDNA (por. HEWITT 2004; MALIOUCHENKO i in. 2007).

Wykazane zróżnicowanie haplotypowe nie koreluje z różnicami morfologicznymi pomiędzy wyróżnianymi taksonami w kompleksie *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* (HEMPEL 2011). Pewną odrębność i zmienność haplotypów można jedynie odnieść do *M. ciliata* subsp. *magnolii* z Półwyspu Iberyjskiego (Tab. 1). Wcześniejsze badania AFLP wykazały natomiast, że taksony kompleksu są wyraźnie odrębne genetycznie (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2006, 2009, 2011), o czym decyduje obecność unikatowych fragmentów AFLP, których dla *M. transsilvanica* stwierdzono 25, a dla *M. ciliata* – 77. Takie fragmenty AFLP zanotowano również dla *M. ciliata* subsp. *taurica* – 22, a dla subsp. *magnolii* – 50 (SZCZEPANIAK msk.). W przywoływanej analizie AFLP zarówno *M. transsilvanica*, jak i *M. ciliata* charakteryzowały się genetycznym zróżnicowaniem wewnątrzgatunkowym związanym z położeniem geograficznym. O odrębności genetycznej populacji zadecydowała również obecność rzadkich markerów DW (ang. *frequency-down-weighted marker*; SCHÖNSWETTER & TRIBSCH 2005). Dla *M. ciliata* najwyższe wartości DW stwierdzono w populacjach z Półwyspów Bałkańskiego, Apenińskiego i Iberyjskiego. W przypadku *M. transsilvanica* najwięcej rzadkich markerów stwierdzono w Europie wschodniej, na Krymie oraz na Podolu (SZCZEPANIAK msk.).

Zmienność genetyczna jest warunkowana przez cechy biologii gatunku, a zwłaszcza przez możliwości rozsiewania, zdolności kolonizacyjne oraz system rozmnażania (NYBOM & BARTISH 2000). W badanym kompleksie stwierdzono istnienie znacząco wyższej wartości składowej międzypopulacyjnej w stosunku do składowej wewnątrzpopulacyjnej całkowitego zróżnicowania genetycznego ( $F_{ST}$ ; na podstawie badań AFLP) (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2009, 2011). Taki podział zmienności genetycznej jest charakterystyczny dla gatunków o wysokim udziale samopylności i/lub apomiksji w sposobie rozmnażania, która prowadzi do utrwalania genów w populacjach i decyduje o ich istotnej odrębności genetycznej (TYLER 2004; SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2009, 2011; SZCZEPANIAK msk.). Niski poziom zmienności i wyraźna struktura genetyczna gatunków jest dodatkowo warunkowana

fragmentacją kserotermicznych siedlisk występowania i nieznacznym przepływem genów oraz występującą izolacją geograficzną małych populacji na skraju zasięgu, w których obserwuje się efekty działania dryfu genetycznego (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2009).

Badania AFLP wykazały również istnienie struktury geograficznej w kompleksie *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* (SZCZEPANIAK msk.). Stwierdzono istotną korelację pomiędzy odległościami genetycznymi i geograficznymi zarówno na poziomie regionalnym, jak i w obrębie regionów geograficznych ( $P < 0,05$ ). Oszacowane wartości  $F_{ST}$  dla poszczególnych taksonów (*M. ciliata* –  $F_{ST} = 0,75$ ; *M. transsilvanica* –  $F_{ST} = 0,79$ ; *M. ciliata* subsp. *magnolii* –  $F_{ST} = 0,72$ ) oscylowały wokół średniej ( $F_{ST} = 0,7$ ) dla gatunków samopylnych (NYBOM & BARTISH 2000). Jedynie dla *M. ciliata* subsp. *taurica*  $F_{ST}$  było nieco niższe ( $F_{ST} = 0,59$ ), co może być związane z łatwiejszym przepływem genów pomiędzy stosunkowo blisko położonymi populacjami na Krymie, skąd pochodził materiał do badań. Wysokie wartości  $F_{ST}$  są rzadko stwierdzane wśród traw, chociaż istnieją wyjątki. Dla samopylnych gatunków rodzaju *Elymus* wartości  $G_{ST}$  zawierały się w przedziale od 0,55 do 0,95 (KNAPP & RICE 1996; SUN i in. 2001; YAN i in. 2007). U samopylnego gatunku *Stipa capillata*  $F_{ST} = 0,86$  (HENSEN i in. 2010), podczas gdy u pokrewnych *S. krylovii* i *S. grandis* stwierdzono odpowiednio  $G_{ST} = 0,382$  (ZHAO i in. 2006) i  $G_{ST} = 0,199$  (DAN i in. 2006).

### Filogeografia kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie

Określenie struktury genetycznej kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* dało możliwość podjęcia dyskusji o czynnikach wpływających na rozmieszczenie i zmienność kompleksu w Europie. Powtarzające się okresy izolacji południowych obszarów refugialnych podczas czwartorzędowych zlodowaceń sprzyjały różnicowaniu i specjacji w obrębie badanego kompleksu, co znalazło odzwierciedlenie we współczesnym zlokalizowaniu centrum różnicowania kompleksu na obszarze wybrzeża Morza Śródziemnego (Półwysp Iberyjski i Apeniński) oraz w mniejszym stopniu na Bałkanach.

Wyniki badań zmienności i zróżnicowania genetycznego sugerują, że taksony kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie mogą wywodzić się z jednego lub kilku obszarów refugialnych w Europie południowej. Występowanie dominującego w Europie haplotypu H1 zarówno na Półwyspie Iberyjskim, Apenińskim jak i Bałkańskim, wskazuje, że każdy z tych obszarów osobno, albo wszystkie jednocześnie mogły być potencjalnymi źródłami postglacjalnej rekolonizacji Europy zachodniej i środkowej. Jednak, na co wskazują wyniki badań AFLP kompleksu (SZCZEPANIAK msk.), duże znaczenie w kształtowaniu współczesnego zasięgu kompleksu miały refugia zlokalizowane na Półwyspie Iberyjskim, w Pirenejach (GÓMEZ & LUNT 2006) oraz w Alpach Wschodnich (TRIBSCH & SCHÖNSWETTER 2003) i/lub na północnym wybrzeżu Morza Adriatyckiego (MAGRI 2008). Za znaczącym udziałem genetycznej linii iberyjskiej w rekolonizowaniu Europy przemawiają wysokie wartości DW dla populacji 5, 6, 7, co świadczy o ich stosunkowo długiej izolacji, prowadzącej w efekcie do akumulacji rzadkich markerów genetycznych i wzrastania odrębności populacji (SZCZEPANIAK msk.). Linia iberyjska prawdopodobnie migrowała z refugium w kierunku północno-wschodnim przez południową i środkową Francję, Szwajcarię, dochodząc do środkowych Niemiec (SZCZEPANIAK msk.). Półwysp Iberyjski należy do

najważniejszych obszarów refugialnych w Europie (HEWITT 1999, 2001; GÓMEZ & LUNT 2006 i lit. tam cytowana). Wysoki poziom endemizmu we florze i faunie Półwyspu Iberyjskiego wskazuje na długotrwałe zachowanie organizmów *in situ* oraz na zachodzące na tym obszarze intensywne procesy różnicowania i specjacji. Wiele badań filogenetycznych, dotyczących roślin i zwierząt dowodzi, że Półwysep Iberyjski był nie tylko miejscem różnicowania się gatunków, lecz także wyjściowym źródłem rekolonizacji północnych szerokości geograficznych w Europie po ostatnim zlodowaceniu (COMES & KADEREIT 1998; TABERLET i in. 1998; HEWITT 1999; GRIVET & PETIT 2002).

Z pewnym prawdopodobieństwem można przypuszczać, że w procesie kształtowania europejskiego zasięgu kompleksu *Melica ciliata* – *M. transsilvaniaca* znaczenie mogły mieć również obszary ostojowe położone dalej na północ, np. na przedpolu Alp Wschodnich (TRIBSCH & SCHÖNSWETTER 2003). Na podstawie porównawczych badań filogeograficznych i endemizmu potwierdzono, że był to obszar refugialny dla wielu gatunków górskich (TRIBSCH & SCHÖNSWETTER 2003). Wyniki badań AFLP kompleksu sugerują, że mogły tam również przetrwać inne grupy roślin (SZCZEPANIAK msk.). Teren przedpola Alp Wschodnich niezależnie, bądź w łączności z północnym wybrzeżem Morza Adriatyckiego, prawdopodobnie był źródłem migracji linii genetycznej, która rozprzestrzeniła się w kierunku Europy zachodniej i środkowej (Węgry, Austria, Czechy, Słowacja) i północnej, docierając do południowej części Półwyspu Skandynawskiego (SZCZEPANIAK msk.).

Natomiast niektóre apenińskie i bałkańskie linie genetyczne występowały tylko w ograniczonych regionach, czego dowodzi rozmieszczenie unikatowego haplotypu apenińskiego (H11), oraz haplotypów wspólnych dla Europy południowej i południowo-zachodniej (H3–H10), a nieobecnych dalej na północy (Ryc. 1). Badania AFLP również wykazały istnienie izolowanej apenińskiej linii genetycznej w badanym kompleksie (SZCZEPANIAK msk.). Wyraźnie zaznacza się także odrębność populacji z Półwyspu Bałkańskiego, gdzie stwierdzono obecność unikatowego haplotypu bałkańskiego (H2). Otrzymane wyniki cpDNA są zgodne z wynikami AFLP, które również potwierdziły występowanie w Europie południowej (Rumunia) oraz południowo-wschodniej (Bułgaria, Grecja) dwóch odrębnych i izolowanych linii genetycznych z bardzo niewielkim udziałem markerów z Europy południowo-zachodniej (SZCZEPANIAK msk.).

Stosunkowo duże zróżnicowanie haplotypów cpDNA zanotowano na obszarze Półwyspu Krymskiego, gdzie występowały: haplotyp H1, wspólny z całą Europą, haplotyp H2, występujący na Bałkanach oraz haplotyp H4, który stwierdzono również w centralnej części Półwyspu Apenińskiego (Ryc. 1). Można przypuszczać, że obecność populacji z najszerzej rozmieszczonymi haplotypami H1 i H2 świadczy o historycznej łączności Krymu z obszarami położonymi na zachód (DRESCHER i in. 2007). Natomiast populacja 66 z rzadkim haplotypem H4 przypuszczalnie stanowi reliktową pozostałość szerzej w przeszłości rozmieszczonego haplotypu, występującego na obszarze południowej Europy i Półwyspu Krymskiego.

Fluktuacje klimatyczne, rozpoczęte we wczesnym Eocenie, spowodowały rozprzestrzenienie się zbiorowisk trawiastych, na skutek szybkiego różnicowania ewolucyjnego odpornych na suszę gatunków traw (KELLOGG 2001). Migracja do Europy gatunków „stepowych”, wschodnich i południowo-wschodnich, odbywała się od dawna i to wielokrotnie, zapewne już od trzeciorzędu (PAWŁOWSKA 1977). Nasilenie tego napływu przypadło na schyłek

ostatniego glacjału i na starszy postglacjał. Obecność wspólnych markerów genetycznych w populacjach *Melica transsilvanica* na gradencie wschód–zachód, sugeruje efektywniejszy, historyczny przepływ genów w czasie, kiedy zbiorowiska stepowe zajmowały znacznie większy i zwarty obszar (TYLER 2004; SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2009). Począwszy od końca Eocenu na skutek zmian klimatu w kierunku bardziej suchego, nastąpił rozwój zbiorowisk trawiastych w Eurazji, zastępując poprzednio występujące tam zbiorowiska leśne (POTT 1995). Ze względu na współczesne dysjunktywne występowanie roślinności kserotermicznej w zachodniej i środkowej Europie, ogromne odległości między typowym eurazjatyckim stepem a europejskimi murawami kserotermicznymi oraz znaczące różnice klimatyczne, jest prawie niemożliwe, aby obecnie gatunki stepowe mogły w sposób naturalny migrować do Europy (BREDEKAMP i in. 2002). A zatem, dysjunktywnie rozmieszczone murawy kserotermiczne w tej części Europy mogą być polodowcowymi relikdami, które należałoby uważać za pozostałości jednego zbiorowiska, łączącego w przeszłości ciągłym pasem zachodnią i środkową Europę z południową i wschodnią Eurazją (POTT 1995).

### Historia biogeograficzna *Melica transsilvanica* w Polsce

Postglacialna historia migracji roślinności kserotermicznej na teren Polski była przedmiotem zainteresowań badawczych co najmniej od pierwszej połowy XX w. (por. KOZŁOWSKA 1925, 1931; GAJEWSKI 1937; KORNAŚ 1955; CEYNOWA 1968; MEDWECKA-KORNAŚ & KORNAŚ 1977; PAWŁOWSKA 1977 i lit. tam cytowana).

Hipotezy dotyczące aspektów czasowych i przestrzennych migracji gatunków kserotermicznych na obszar Polski wskazują, że główne szlaki wędrówek prowadziły: od południowego-wschodu (1), z terenów pontyjskich i Podola wzdłuż doliny Dniestru i następnie północnej krawędzi Karpat (poprzez Wyżynę Lubelską i Małopolską), a stąd na północ po dolną Wisłę (GAJEWSKI 1937; SZAFER 1946, 1977) oraz od południa (2), z Niziny Pannońskiej poprzez największe obniżenia w łańcuchach górskich Sudetów i Karpat: Bramę Morawską i przełęczę Beskidu Niskiego (PAWŁOWSKI 1925; SZAFER 1926; KORNAŚ 1955; CYUNEL 1959). Szlak od północnego-zachodu (3) prowadził z Turynii i Niziny Niemieckiej Pradolina Toruńsko-Eberswaldzką do Polski północnej (SZAFER 1946, 1977; CEYNOWA 1968). W literaturze spotyka się również hipotezę o szlaku migracyjnym z zachodu (4): ze wschodniego przedpola Alp i południowej części Niemiec wzdłuż północnej krawędzi Sudetów (SZAFER 1977). W ostatnim czasie, przeglądu obowiązujących hipotez dotyczących szlaków holocenów migracji roślin kserotermicznych na obszar Polski dokonał PAUL (2010, 2012).

Ostatnie badania zmienności morfologiczno-genetycznej wykazały, że w Polsce, spośród taksonów badanego kompleksu, występuje jedynie *Melica transsilvanica* (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2011), nie potwierdzono natomiast obecności *M. ciliata*, podawanej uprzednio z Przedgórze Sudeckiego i Sudetów (np. SZAFER 1919; FABISZEWSKI 1963; KWIATKOWSKI 1995; SZCZEŃNIAK 1998, 2001). *M. transsilvanica* osiąga na terenie Polski północną granicę ciągłego zasięgu i reprezentuje eurosyberyjsko-irano-turański element geograficzny (ZAJĄC & ZAJĄC 2009). Gatunek rośnie w zbiorowiskach z klasy *Festuco-Brometea* i jest charakterystyczny dla związku *Seslerio-Festucion duriusculae*, wapieniolubnych muraw

naskalnych (MATUSZKIEWICZ 2005). *M. transsilvanica* najczęściej występuje w Pieninach i na Wyżynie Krakowsko-Częstochowskiej (GRODZIŃSKA 1976; MICHALIK 1978; ZARZYCKI 1981), rzadziej – w Beskidzie Wyspowym, Sądeckim i w Gorcach (KORNAŚ 1955), natomiast w Sudetach gatunek został obecnie potwierdzony na kilkunastu stanowiskach i jest uważany za zagrożony (SZCZĘŚNIAK 2003, 2007).

Wyniki analizy zróżnicowania cpDNA wykazały, że na terenie Polski występuje tylko haplotyp H1, który jest dominujący i najszerzej rozmieszczony w Europie (Ryc. 1). Nie stwierdzono zróżnicowania haplotypowego pomiędzy populacjami *Melica transsilvanica* z Sudetów, Wyżyny Krakowsko-Częstochowskiej i Pienin, natomiast w badaniach AFLP, nawet w skali Polski, stwierdzono wyraźny geografizm, związany z odrębnością genetyczną populacji (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2007).

*Melica transsilvanica* prawdopodobnie przywędrowała na teren Polski z południa, gdzie głównym miejscem pochodzenia była Nizina Pannońska, na co wskazują wyniki AFLP (SZCZEPANIAK msk.). Ta linia genetyczna rozdzieliła się następnie na dwie podgrupy. Pierwsza prowadziła ze Spisza przełomowymi dolinami rzecznyymi Dunajca i Popradu w Beskidy i Pieniny, gdzie obecnie gatunek najliczniej występuje w Polsce. Druga migrowała przez Morawy i Bramę Morawską na zachód w Sudety i na wschód na Wyżynę Małopolską, co jest zgodne z podawanymi drogami migracyjnymi prowadzącymi z południa dla wielu grup gatunków (SZAFER 1946, 1977). Dodatkowa możliwa droga migracji *M. transsilvanica* na teren Polski mogła prowadzić z południowych Niemiec i zachodnich Czech, wzdłuż północnego obniżenia Sudetów w kierunku wschodnim. Analiza konserwatywnych, wolno ewoluujących sekwencji cpDNA wykazała tożsamość i brak zróżnicowania pomiędzy tymi dwoma prawdopodobnymi liniami genetycznymi, co wskazuje na ich młody, postglacjalny czas migracji i wspólne pochodzenie. Natomiast badania wysoce polimorficznych markerów AFLP, podlegających szybkim zmianom, potwierdziły istnienie dwóch powyższych linii genetycznych w całym zakresie zróżnicowania genetycznego w kompleksie *M. ciliata* – *M. transsilvanica* w Europie (SZCZEPANIAK msk.).

**Podziękowania.** Serdecznie dziękuję Prof. dr hab. Ludwikowi Freyowi, dr Elżbiecie Cieślak i dr. Michałowi Ronikierowi za konstruktywne dyskusje oraz uwagi dotyczące manuskryptu pracy. Dziękuję również dr. Wojciechowi Paulowi za pomoc w opracowaniu podkładu mapy i zbiór materiałów populacyjnych do badań, dr Elżbiecie Cieślak, dr. Jakubowi Cieślakowi i Katarzynie Cieślak za zbiór materiałów populacyjnych oraz mgr Marcie Sałudze za pomoc w pracach laboratoryjnych. Praca naukowa była finansowana ze środków na naukę w latach 2009–2012 w ramach projektu badawczego (nr grantu N N303 373 436) oraz częściowo w zakresie działalności statutowej Instytutu Botaniki im. W. Szafera PAN w Krakowie.

## LITERATURA

- AVISE J. C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species, s. 447. Harvard University Press, Cambridge MA.
- AVISE J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. – J. Biogeogr. **36**: 3–15.
- BARDY K. E., ALBACH D. C., SCHNEEWEISS G. M., FISCHER M. A. & SCHÖNSWETTER P. 2010. Disentangling phylogeography, polyploid evolution and taxonomy of a woodland herb (*Veronica chamaedrys* group, *Plantaginaceae* s.l.) in southeastern Europe. – Mol. Phyl. Evol. **57**: 771–786.



- BREDENKAMP G. J., SPADA F. & KAZMIERCZAK E. 2002. On the origin of northern and southern hemisphere grasslands. – *Plant Ecol.* **163**: 209–229.
- CEYNOWA M. 1968. Zbiorowiska roślinności kserotermicznej nad dolną Wisłą. – *Stud. Soc. Sc. Torun., Sec. D* **8**(4): 1–156.
- CLEMENT M., POSADA D. & CRANDALL K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. – *Mol. Ecol.* **9**: 1657–1659.
- COMES H. P. & KADEREIT J. W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. – *Trends Plant Sci.* **3**: 432–438.
- CYUNEL E. 1959. Studia nad rozmieszczeniem gatunków kserotermicznych w polskich Karpatach zachodnich. – *Fragm. Florist. Geobot.* **5**(3): 409–439.
- DAN S., MENGLI Z., BING H. & GUODONG H. 2006. Examining the genetic diversity of *Stipa grandis* under various grazing pressures. – *Acta Ecol. Sin.* **26**: 3175–3183.
- DANECK H., ABRAHAM V., FÉR T. & MARHOLD K. 2011. Phylogeography of *Lonicera nigra* in Central Europe inferred from molecular and pollen evidence. – *Preslia* **83**: 237–257.
- DAVIS P. H. 1985 (red.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. 9th ed. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- DRESCHER A., PROTS B. & YENA A. 2007. Notes on Crimean flora (botanical excursion on the Crimean peninsula). – *Fritschiana* **55**: 9–70.
- DVOŘÁKOVÁ H., FÉR T. & MARHOLD K. 2010. Phylogeographic pattern of the European forest grass species *Hordeum europaeus*: cpDNA evidence. – *Flora* **205**: 418–423.
- FABISZEWSKI J. 1963. O roślinności ciepłolubnej na bazaltach Góry Krzyżowej koło Strzegomia. – *Chrońmy Przyr. Ojcz.* **19**: 16–21.
- FÉR T., VAŠAK P., VOJTA J. & MARHOLD K. 2007. Out of the Alps or Carpathians? Origin of Central European populations of *Rosa pendulina*. – *Preslia* **79**: 367–376.
- FIJLHEIM S., ROGNLI O. A., FOSNES K. & BROCHMANN C. 2006. Phylogeographical history of the widespread meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) inferred from chloroplast DNA sequences. – *J. Biogeogr.* **33**: 1470–1478.
- GAJEWSKI W. 1937. Elementy flory polskiego Podola. – *Pl. Polon.* **5**: 1–139.
- GOLENBERG E. M., CLEGG M. T., DURBIN M. L., DOEBLEY J. & MA D. P. 1993. Evolution of a noncoding region of the chloroplast genome. – *Mol. Phylogenet. Evol.* **2**: 52–64.
- GÓMEZ A. & LUNT D. H. 2006. Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. – W: S. WEISS & N. FERRAND (red.), *Phylogeography of southern European refugia*, s. 155–188. Springer, Netherlands.
- GRIVET D. & PETIT R. J. 2002. Phylogeography of the common ivy (*Hedera* sp.) in Europe: genetic differentiation through space and time. – *Mol. Ecol.* **11**: 1351–1362.
- GRODZIŃSKA K. 1976. Rośliny naczyniowe Skalic Nowotarskich i Spiskich (Pieniński Pas Skałkowy). – *Fragm. Florist. Geobot.* **22**(1–2): 43–127.
- HALL T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – *Nucl. Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- HEMPEL W. 1970. Taxonomische und chorologische Untersuchungen an Arten von *Melica* L. subgen. *Melica*. – *Feddes Repert.* **81**: 131–145.
- HEMPEL W. 2004. Die infragenerische Gliederung der Gattung *Melica* L. – *Haussknechtia* **10**: 169–198.
- HEMPEL W. 2011. Revision und Phylogenie der Arten der Gattung *Melica* L. (*Poaceae*) in Eurasien und Nordafrika. – *Feddes Repert.* **122**(1–2): 1–253.

- HENSEN I., KILIAN C., WAGNER V., DURKA W., PUSCH J. & WESCHE K. 2010. Low genetic variability and strong differentiation among isolated populations of the rare steppe grass *Stipa capillata* L. in Central Europe. – *Plant Biol.* **12**(3): 526–536.
- HEWITT G. M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. – *Biol. J. Linn. Soc.* **68**: 87–112.
- HEWITT G. M. 2000. The genetic legacy of the ice ages. – *Nature* **405**: 907–913.
- HEWITT G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. – *Mol. Ecol.* **10**: 537–549.
- HEWITT G. M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillation in the Quaternary. – *Philos. T. Roy. Soc. B* **359**: 183–195.
- HINKOVA C. 1963. *Melica* L. – W: D. JORDANOV (red.), Flora na Narodna Republika Bulgaria **1**, s. 358–363. Bulgarian Academy of Sciences, Sofia.
- HONNAY O., COART E., BUTAYE J., ADRIAENS D., VAN GLABEKE S. & ROLDÁN-RUIZ I. 2006. Low impact of present and historical landscape configuration on the genetics of fragmented *Anthyllis vulneraria* populations. – *Biol. Conserv.* **127**(4): 411–419.
- HULTÉN E. & FRIES M. 1986. Atlas of North European vascular plants. North of the Tropic of Cancer **1**, s. 498, **3**, s. 1172. Koeltz Scientific Books, Königstein.
- INGVARSSON P. K., RIBSTEIN S. & TAYLOR D. R. 2003. Molecular evolution of insertions and deletion in the chloroplast genome of *Silene*. – *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1737–1740.
- JOHANNESSON K. & ANDRÉ C. 2006. Life on the margin: genetic isolation and diversity loss in a peripheral marine ecosystem, the Baltic Sea. – *Mol. Ecol.* **15**(8): 2013–2029.
- KELCHNER A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. – *Ann. Mol. Bot. Gard.* **87**: 482–498.
- KELLOGG E. A. 2001. Evolutionary history of the grasses. – *Plant Physiol.* **125**: 1198–1205.
- KNAPP E. E. & RICE K. J. 1996. Genetic structure and gene flow in *Elymus glaucus* (blue wild rye): implications for native grassland restoration. – *Rest. Ecol.* **4**: 1–10.
- KORNAŚ J. 1955. Charakterystyka geobotaniczna Górców. – *Monogr. Bot.* **3**: 1–216.
- KOZŁOWSKA A. 1925. La variabilité de *Festuca ovina* L. en rapport avec la succession des associations stepiques sur le plateau de la Petite Pologne. – *Bull. Acad. Sci. Polon. Ser. B* **3–4**: 325–377.
- KOZŁOWSKA A. 1931. The genetic elements and the origin of the steppe flora in Poland. – *Mém. D'Acad. Pol. Sc. L. Ser. B* **4**: 1–110 + 10 tabl.
- KWIATKOWSKI P. 1995. Szata roślinna projektowanego rezerwatu leśnego „Wąwóz Lipy” na Pogórzu Kaczawskim (Sudety Zachodnie). – *Chrońmy Przyr. Ojcz.* **52**: 167–184.
- LLORENS T. M., AYRE D. J. & WHELAN R. J. 2004. Evidence for ancient genetic subdivision among recently fragmented populations of the endangered shrub *Grevillea caleyi* (Proteaceae). – *Heredity* **92**: 519–526.
- LYNCH M., CONERY J. & BURGER R. 1995. Mutation accumulation and the extinction of small populations. – *Amer. Nat.* **146**(4): 489–518.
- MAGRI D. 2008. Patterns of post-glacial spread and the extent of glacial refugia of European beech (*Fagus sylvatica*). – *J. Biogeogr.* **35**: 450–463.
- MALIOUCHENKO O., PALME A. E., BUONAMICI A., VENDRAMIN G. G. & LASCoux M. 2007. Comparative phylogeography and population structure of European *Betula* species, with particular focus on *B. pendula* and *B. pubescens*. – *J. Biogeogr.* **34**: 1601–1610.
- MATUSZKIEWICZ W. 2005. Przewodnik do oznaczania zbiorowisk roślinnych Polski, s. 537. Wydawnictwo Naukowe PWN S.A., Warszawa.

- MEDWECKA-KORNAŚ A. & KORNAŚ J. 1977. Zespoły stepów i suchych muraw. – W: W. SZAFER & K. ZARZYCKI (red.), Szata roślinna Polski **1**, Wyd. 3, s. 352–366. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- MICHALIK S. 1978. Rośliny naczyniowe Ojcowskiego Parku Narodowego. – *Studia Naturae Ser. A* **16**: 1–171.
- MOORE D. M. 1982. *Flora Europaea check-list and chromosome index*. Cambridge University Press, Cambridge.
- MUELLER-BIENIEK A. & NALEPKA D. 2010. Czy znaleziska ostnicy (*Stipa* sp.) z neolitu południowych Kujaw świadczą o istnieniu muraw kserotermicznych w optimum klimatycznym? – W: H. RATYŃSKA & B. WALDON (red.), Ciepłolubne murawy w Polsce, stan zachowania i perspektywy ochrony, s. 235–248. Wydawnictwo Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz.
- NACIRI Y. & GAUDEUL M. 2007. Phylogeography of the endangered *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*) in the European Alps. – *Mol. Ecol.* **16**: 2721–2733.
- NALEPKA D. 2005. Late Glacial and Holocen palaeoecological conditions and changes of vegetation cover under early farming activity in the south Kujawy region (central Poland). – *Acta Paleobot. Supp.* **6**.
- NYBOM H. & BARTISH I. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. – *Perspect. Plant Ecol.* **3**: 93–114.
- PALME A. E. & VENDRAMIN G. G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. – *Mol. Ecol.* **11**: 1769–1779.
- PAPP C. 1933. Monographie der europäischen Arten der Gattung *Melica* L. – *Bot. Jahrb. Syst.* **64**: 275–348.
- PAPP C. & BELDIE A. L. 1972. Genul 720. *Melica* L. – W: T. SĂVULESCU (red.), Flora Republicii Socialiste România **12**, s. 239–250. Academiei Republicii Socialiste România, Bucharest.
- PAUL W. 2010. Szlaki holocenijskich migracji roślin kserotermicznych na ziemię Polski – przegląd ustaleń i hipotez oraz perspektywy badań. – W: H. RATYŃSKA & B. WALDON (red.), Ciepłolubne murawy w Polsce, stan zachowania i perspektywy ochrony, s. 55–65. Wydawnictwo Uniwersytetu Kazimierza Wielkiego, Bydgoszcz.
- PAUL W. 2012. Xerothermic species of the genus *Campanula* in Poland – a model for the phylogeographical assessment of reconstruction of post-glacial migration routes. – *Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska Sec. C* **67**(1): 27–36.
- PAWŁOWSKA S. 1977. Charakterystyka statystyczna i elementy flory polskiej. – W: W. SZAFER & K. ZARZYCKI (red.), Szata roślinna Polski **1**, Wyd. 3, s. 129–206. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- PAWŁOWSKI B. 1925. Stosunki geobotaniczne Sądecczyzny. – *Pr. Monogr. Komis. Fizjogr. Polskiej Akademii Umiejętności* **1**: 1–342.
- PÄRTEL M., BRUNN H. H. & SAMMUL M. 2005. Biodiversity in temperate European grasslands: origin and conservation. – *Grassland Sci. Eur.* **10**: 1–14.
- POSADA D. & CRANDALL K. A. 2001. Intraspecific gene genealogies: tree grafting into networks. – *Trends Ecol. Evol.* **16**: 37–45.
- POSCHLOD P. & WALLISDEVRIES M. F. 2002. The historical and socio-economic perspective of calcareous grasslands – lessons from the distant and recent past. – *Biol. Conserv.* **104**: 361–376.
- POTT R. 1995. The origin of grassland plant species and grassland communities in Central Europe. – *Fitosociologia* **29**: 7–32.
- RALSKA-JASIEWICZOWA M., LATAŁOWA M., WASYLIKOWA K., TOBOLSKI K., MADEYSKA E., WRIGHT JR. H. E. & TURNER CH. (red.) 2004. Late glacial and Holocene history of vegetation in Poland based on isopollen maps, s. 95–104. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.

- REJZKOVA E., FÉR T., VOJTA J. & MARHOLD K. 2008. Phylogeography of the forest herb *Carex pilosa* (Cyperaceae). – Bot. J. Linn. Soc. **158**: 115–130.
- RONIKIER M., COSTA A., AGUILAR J. F., FELINER G. N., KÜPFER P. & MIREK Z. 2008. Phylogeography of *Pulsatilla vernalis* (L.) Mill. (Ranunculaceae): chloroplast DNA reveals two evolutionary lineages across central Europe and Scandinavia. – J. Biogeogr. **35**: 1650–1664.
- SCHÖNSWETTER P. & TRIBSCH A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). – Taxon **54**: 725–732.
- SCHÖNSWETTER P., POPP M. & BROCHMANN C. 2006. Central Asian origin of and strong genetic differentiation among populations of the rare and disjunct *Carex atrofusca* (Cyperaceae) in the Alps. – J. Biogeogr. **33**: 948–956.
- SHAW J., LICKEY E. B., BECK J. T., FARMER S. B., LIU W., MILLER J., SIRIPUN K. C., WINDER C. T., SCHILLING E. E. & SMALL R. L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. – Am. J. Bot. **92**: 142–166.
- SHAW J., LICKEY E. B., SCHILLING E. E. & SMALL R. L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. – Am. J. Bot. **94**: 275–288.
- STEBBINS G. L. 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. – Ann. Missouri Bot. Gard. **72**: 824–832.
- STEWART J. R. & LISTER A. M. 2001. Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. – Trends Ecol. Evol. **16**: 608–613.
- SUN G.-L., DIAZ O., SALOMON B. & VON BOTHMER R. 2001. Genetic diversity and structure in a natural *Elymus caninus* population from Denmark based on microsatellite and isozyme analyses. – Plant Syst. Evol. **227**: 235–244.
- SZAFER W. 1919. Rodzina Gramineae, trawy. – W: M. RACIBORSKI & W. SZAFER (red.), Flora polska. Rośliny naczyniowe Polski i ziem ościennych. Paprotniki, iglaste i jednoliścienne **1**, s. 230–365. Akademia Umiejętności, Kraków.
- SZAFER W. 1926. Znaczenie Bramy Morawskiej jako drogi migracji roślin z południa do Polski. Sborn. I Sjezdu Slovanských Geografu a Etnografu v Praze, 1924, Praha.
- SZAFER W. 1946. Zarys historii rozwoju flory Holarktydy. – Roczn. Pol. Tow. Geolog. **16**: 177–252.
- SZAFER W. 1977. Szata roślinna Polski niżowej – W: W. SZAFER & K. ZARZYCKI (red.), Szata roślinna Polski **2**, Wyd. 3, s. 17–188. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa.
- SZCZEPANIAK M. & CIEŚLAK E. 2006. Genetic variation and structure in natural populations of *Melica ciliata* and *M. transsilvanica* (Poaceae) as indicated by AFLP markers. – Biodiv. Res. Conserv. **3–4**: 39–43.
- SZCZEPANIAK M. & CIEŚLAK E. 2007. Low level of genetic variation within *Melica transsilvanica* populations from the Kraków-Częstochowa Upland and the Pieniny Mts. revealed by AFLPs analysis. – Acta Soc. Bot. Pol. **76**(4): 321–331.
- SZCZEPANIAK M. & CIEŚLAK E. 2009. Genetic diversity of *Melica transsilvanica* Schur (Poaceae) at its northern range limit. – Acta Biol. Cracov. Ser. Bot. **51**(1): 71–82.
- SZCZEPANIAK M. & CIEŚLAK E. 2011. Genetic and morphological differentiation between *Melica ciliata* L. and *M. transsilvanica* Schur (Poaceae) in Europe reveals the non-presence of *M. ciliata* in the Polish flora. – Acta Soc. Bot. Pol. **80**(4): 301–313.
- SZCZEPANIAK M. msk. Genetic differentiation and phylogeographic relationships among European *Melica* species, sect. *Dalycum* Dumort., subsect. *Ciliatae* (Poaceae).
- SZCZEŚNIAK E. 1998. Murawy ze związku *Alyso-Sedion* Oberd. et Th. Müll. 1961 na Pogórzu Wałbrzysko-Bolkowskim. – Bad. Fizjogr. Pol. Zach. Ser. Botanika. **47**: 177–193.

- SZCZEŚNIAK E. 2001. *Melica ciliata* L. – perlówka orzęsiona. – W: R. KAŻMIERCZAKOWA & K. ZARZYCKI (red.), Polska czerwona księga roślin. Paprotniki i rośliny kwiatowe, s. 449–451. Instytut Botaniki im. W. Szafera, Polska Akademia Nauk, Instytut Ochrony Przyrody, Polska Akademia Nauk, Kraków.
- SZCZEŚNIAK E. 2003. Rzadkie i zagrożone gatunki ciepłolubnych muraw na Dolnym Śląsku. – W: Z. KAĆKI (red.), Zagrożone gatunki flory naczyniowej Dolnego Śląska, s. 85–107. Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski, Polskie Towarzystwo Przyjaciół Przyrody „pro Natura”, Wrocław.
- SZCZEŚNIAK E. 2007. *Melica transsilvanica* (Poaceae) in Poland. – W: L. FREY (red.), Biological issues in grasses, s. 21–35. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, Kraków.
- TABERLET P., GIELLY L., PAUTOU G. & BOUVET J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. – *Plant Mol. Biol.* **17**: 1105–1109.
- TABERLET P., FUMAGALLI L., WUST-SAUCY A.-G. & COSSON J.-F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. – *Mol. Ecol.* **7**: 453–464.
- TRIBSCH A. & SCHÖNSWETTER P. 2003. Patterns of endemism and comparative phylogeography confirm palaeoenvironmental evidence for Pleistocene refugia in the Eastern Alps. – *Taxon* **52**(3): 477–498.
- TUTIN T. G. 1980. *Melica* L. – W: T. G. TUTIN, V. H. HEYWOOD, N. A. BURGESS, D. M. MOORE, D. H. VALENTINE & S. M. WALTERS i in. (red.), *Flora Europaea* **5**, s. 178–179. Cambridge University Press, Cambridge.
- TYLER T. 2002. Large-scale geographic patterns of genetic variation in *Melica nutans*, a widespread Eurasian woodland species. – *Plant Syst. Evol.* **236**: 73–87.
- TYLER T. 2004. Studies in the *Melica ciliata* – complex: 1. Distribution of allozyme variation within and among individuals, populations and geographic regions. – *Plant Syst. Evol.* **248**: 1–30.
- VILA M., VIDAL-ROMANÍ J. R. & BJÖRKLUND M. 2005. The importance of time scale and multiple refugia: incipient speciation and admixture of lineages in the butterfly *Erebia triaria* (Nymphalidae). – *Mol. Phylogenet. Evol.* **36**: 249–260.
- VRANCKEN J., BROCHMANN C. & WESSELINGH R. A. 2009. How did an annual plant react to Pleistocene glaciations? Postglacial history of *Rhinanthus angustifolius* in Europe. – *Biol. J. Linn. Soc.* **98**: 1–13.
- WILLIS K. J. & VAN ANDEL T. H. 2004. Trees or no trees? The environments of central and eastern Europe during the Last Glaciation. – *Quatern. Sci. Rev.* **23**: 2369–2387.
- YAN X., GUO Y., ZHOU H. & WANG K. 2007. Isozyme variability among *Elymus* species indigenous to the Tibetan and Inner Mongolian Plateaus. – *Grassland Sci.* **53**: 91–96.
- ZAJĄC M. & ZAJĄC A. 2009. Elementy geograficzne rodzimej flory Polski, s. 94. Nakładem Pracowni Chorologii Komputerowej Instytutu Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
- ZARZYCKI K. 1981. Roślin naczyniowe Pienin. Rozmieszczenie i warunki występowania. Polska Akademia Nauk, Instytut Botaniki, PWN, Warszawa–Kraków.
- ZHAO N.-X., GAO Y.-B., WANG J.-L. & REN A.-Z. 2006. Genetic diversity and population differentiation of the dominant species *Stipa krylovii* in the Inner Mongolia Steppe. – *Biochem. Genet.* **44**: 513–526.

## SUMMARY

Various historical and current processes have contributed to shaping the distribution of the European biotas. Climatic oscillations during the Quaternary ice age were the main causes of repeated species extinction during cold periods and their migration during warm periods and effected in accelerating evolution of species. Additionally, the present pattern of genetic diversity and differentiation is also affected by traits of species life history.

*Melica ciliata* – *M. transsilvanica* is a complex of sub-Mediterranean-continental taxa. Its range comprises also disjunct areas in the southern part of the Scandinavian Peninsula and in north-western Africa.

Intricate morphological variability makes the *M. ciliata* – *M. transsilvanica* complex (e.g. section *Dalycum* Dumort., subsection (Lavrenko) Bor; HEMPEL 2011) a taxonomically problematic group.

The phylogeographic patterns of *Melica ciliata* – *M. transsilvanica* complex were determined in order to reconstruct its postglacial history, including identifying potential glacial refugia. Haplotype analysis, based on the non-coding *trnL-trnF* region of chloroplast DNA sequences variability, and the previously obtained AFLP data (SZCZEPANIAK & CIEŚLAK 2006, 2007, 2009, 2011; SZCZEPANIAK msk.) were also used to define the hypothetical differentiation center for the species. The level of genetic diversity within populations and population genetic structure were assessed within studied complex. Eighty eight populations within European distribution area were studied.

The greatest haplotype variation of cpDNA and divergence within complex were detected on Iberian and Apennine Peninsula, and somewhat smaller on the Balkan Peninsula, suggesting main glacial refugia in these regions. Among southern refugia, probably the Iberian could have significantly contributed to postglacial re-colonisation of the northern parts of Europe. Additionally, AFLP data suggested that the second source of postglacial re-colonisation might be refugia in the eastern Alps. The some Apennine and all Balkan lineages were clearly separated and spread locally. A distinctly different haplotype group found on the Crimean Peninsula and in central Italy may represent either relicts of a previously more wide spread ancestor or result of long-distance dispersal.

Phylogeographic and population genetic diversity and differentiation parameters indicated a divergence of four main lineages within complex: eastern European, central and western European (with Scandinavian), Balkan and Iberian with western Mediterranean. Three lineages correspond with morphologically unambiguous species: *Melica transsilvanica* Schur, *M. ciliata* L. and *M. ciliata* subsp. *magnolii* (Gren. & Godr.) Richter.

The cpDNA and AFLPs studies of the complex demonstrated a low level of genetic diversity and a clear genetic structure of species. The results indicate a genetic isolation of populations mainly due to asexual reproduction. The contemporary scattered distribution of suitable habitats and the predominant selfing breeding system of the species strengthen the effect of genetic drift pressure on fixation of unique loci in individual populations. Patterns of phylogeographic diversity were more associated with historical (rather than contemporary) connections, indicating that major shifts in the patterns of the region played an important role in the generation of complex diversity. The shared occurrence of rare AFLP markers between distant populations may indicate more effective gene flow in the past when steppe communities occupied vast and continuous areas.

*Przyjęto do druku: 10.05.2013 r.*